

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-311897

(43)公開日 平成6年(1994)11月8日

(51)Int.Cl.<sup>6</sup>

C 12 Q 1/58  
1/527

識別記号

庁内整理番号  
6807-4B  
6807-4B

F I

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数 1 0 L (全 5 頁)

(21)出願番号

特願平5-103034

(22)出願日

平成5年(1993)4月28日

(71)出願人 000003160

東洋紡績株式会社

大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号

(72)発明者 西矢 芳昭

福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内

(72)発明者 手嶋 真一

福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内

(72)発明者 爰水 重典

福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内

(54)【発明の名称】カリウムイオン測定用組成物

(57)【要約】

【目的】 操作性、定量性、正確性に優れ、ナトリウムイオン結合剤を必要としないカリウムイオン濃度の酵素的測定用組成物を提供する。

【構成】 ウレアアミドリニアーゼ、尿素、アデノシン三磷酸またはその塩、重碳酸イオンおよびマグネシウムイオンを含有するカリウムイオン測定用組成物。

【効果】 ウレアアミドリニアーゼがナトリウムイオンに作用しないことから、ナトリウムイオンの影響を受けることなく、正確に試料中のカリウムイオンを測定できる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 (a) ウレアアミドリーゼ、(b) 尿素、(c) アデノシン三磷酸またはその塩、(d) 重炭酸イオンおよび(e) マグネシウムイオンを含有することを特徴とするカリウムイオン測定用組成物。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明はカリウムイオン測定用組成物に関するものである。体液中のカリウムイオン測定は、急性腎不全や慢性腎不全などの腎疾患、原発性アルデステロン症や続発性アルデステロン症などの内分泌症疾患の、有用な情報を与えるものとして臨床意義が深い。

## 【0002】

【従来の技術】従来、カリウムイオンを含めて体液中の金属イオンの測定法としては、炎光光度計法、化学的測定法、イオン選択電極法などが用いられている。しかしながら、炎光光度計法は操作が煩雑であり、試料の処理能力に問題があった。化学的測定法は、操作が煩雑な上に試薬が高価であるという問題があり、臨床検査の現場で実際には余り用いられていない。イオン選択電極法は、比較的操作が簡単であるが、電極の劣化のため測定時に誤差を生じるという問題がある。また最近では酵素法によるカリウムイオンの測定方法が報告されている(Clin. Chem. 1989; 35:817-820、特開平1-503596号公報など)。この方法は、ビルビン酸キナーゼがカリウムイオンにより活性化されることを利用している。しかしながら、ビルビン酸キナーゼはナトリウムイオンによっても\*

URL

\*カリウムイオンと同様に活性化される。従って、体液中にカリウムイオンよりも多量に存在するナトリウムイオンの影響を軽減するため、高価なナトリウム結合剤を添加する必要があるという問題があった。

## 【0003】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、上記現状に鑑み、操作性、定量性、正確性に優れ、ナトリウムイオン結合剤を必要としないカリウムイオン濃度の酵素的測定用組成物を提供することである。

## 10. 【0004】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、カリウムイオンにより活性化される酵素を用いて検体中のカリウムイオン濃度を測定する方法を鋭意検討したところ、ウレアアミドリーゼがカリウムイオンにより活性化されるが、ナトリウムイオンによっては活性化されないという優れた特性を示すことを見出した。従って、ウレアアミドリーゼを利用することにより、ナトリウムイオン結合剤を使用せずに、体液中のカリウムイオン濃度を短時間に簡単に高精度で正確に測定できることを見出し、

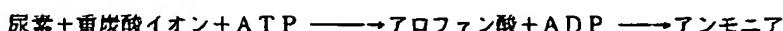
20. 本発明に到達した。

【0005】すなわち、本発明は(a)ウレアアミドリーゼ、(b)尿素、(c)アデノシン三磷酸またはその塩、(d)重炭酸イオンおよび(e)マグネシウムイオンを含有することを特徴とするカリウムイオン測定用組成物である。

【0006】本発明においてウレアアミドリーゼ(URL)は下記反応を触媒する。

## 【化1】

URL

K<sup>+</sup>、Mg<sup>++</sup>

【0007】本発明のカリウムイオン測定用組成物を用いて試料中のカリウムイオンを測定するには、試料中のカリウムイオンとマグネシウムイオンの存在下、基質となる尿素および重炭酸塩とATPにウレアアミドリーゼを作用させ、生成するアンモニアまたはADPを測定する。

【0008】本発明に用いられるウレアアミドリーゼの起源は特に限定されるものではない。例えば、単細胞緑藻、酵母、その他の微生物由来のものが用いられ、好適にはサッカロマイセス属、キャンディダ属のものが用いられる。

【0009】重炭酸イオンとしては、重炭酸ナトリウム、重炭酸リチウムなどの重炭酸塩を使用する。重炭酸塩としてはカリウム塩は使用できない。マグネシウムイオンとしては、硫酸マグネシウム、塩化マグネシウムなどのマグネシウム塩を使用する。

【0010】生成したアンモニアを測定する手段として※50

※は、例えばアンモニアをα-ケトグルタル酸およびNADHまたはNADPHの存在下、グルタミン酸脱水素酵素を作らせ、生成するNADHまたはNADPを紫外部の吸収度減少で測定する方法、アンモニアをグルタミン酸塩およびATPの存在下、グルタミンシンセターゼを作らせ、生成するグルタミンにグルタミンオキシダーゼを作らせ、生成する過酸化水素を測定する方法、アンモニアにサリチル酸と次亜塩素酸ナトリウム及びニトロブルドナトリウムを作らせ、生成するインドフェノールを560 nmの吸光で測定する方法、アンモニア電極により直接測定する方法などがある。

【0011】本発明に用いられるウレアアミドリーゼの測定に使用する酵素濃度は、測定に適した濃度であれば特に制限されるものではないが、通常、0.01~1.0 U/mlの範囲で好適に用いられる。尿素、アデノシン三磷酸またはその塩、重炭酸イオンおよびマグネシウムイオンの使用濃度は、測定に適した濃度であれば特に

制限されるものではないが、尿素は通常、1~500mMの範囲で好適に用いられ、アデノシン三磷酸またはその塩は通常、0.1~10mMの範囲で好適に用いられる。重炭酸イオンは通常、5~500mM、マグネシウムイオンは通常、1~100mMの範囲が好適に用いられる。

【0012】本発明のカリウムイオン測定用組成物のpHは、緩衝液によりpH6~8に保たれているのが好ましく、緩衝液はカリウムイオンを含有しないものであればいかなるものでもよい。例えばトリエタノールアミン緩衝液、GOOD緩衝液、トリス緩衝液などが挙げられる。

【0013】本発明の試薬は必要により、界面活性剤、防腐剤、安定化剤、酵素賦活剤等を加えてもよい。界面活性剤としては、非イオン界面活性剤などが好適に用いられる。防腐剤としては、Na<sub>3</sub>N、抗生物質などが好\*

## 試薬

トリス緩衝液 (pH 8.0)	0.05M
ウレアアミドリーゼ (サッカロマイセス属由来)	0.2U/ml
尿素	200mM
アデノシン三磷酸ナトリウム塩	1mM
硫酸マグネシウム	10mM
重炭酸ナトリウム	4mM
グルタミン酸脱水素酵素 (プロテウス属由来)	100U/ml
α-ケトグルタル酸	1mM
NADPH	0.5mM

## 【0016】測定方法

塩化カリウム水溶液10mMの10段階希釈液と血清10段階希釈液をそれぞれ試料とし、各100μlを採取し、これに上記試薬3mlを加えて30℃で5分間反応させて、340nmにおけるタイムコース (測定波長において酵素反応が進んでいる挙動) と1分間の吸光度変化を求めた。なお、ブランクはカリウムイオン含有被検液の代わりに蒸留水を用いた。

## 【0017】図1に10mM塩化カリウム水溶液と血清※

## 試薬

トリス緩衝液 (pH 7.6)	0.05M
ビルビン酸キナーゼ (ウサギ筋肉由来)	0.5U/ml
ホスホエノールビルビン酸	1mM
アデノシン二磷酸ナトリウム塩	6mM
塩酸マグネシウム	5mM
乳酸脱水素酵素 (微生物由来)	10U/ml
NADH	0.5mM

## 測定方法

塩化カリウム水溶液10mMの10段階希釈液を試料とし、各40μlを採取し、これに上記試薬3.2mlを加えて37℃で5分間反応させて、340nmにおける1分間の吸光度変化を求めた。なお、ブランクはカリウムイオン含有被検液の代わりに蒸留水を求めた。

## 【0019】図4に10mM塩化カリウム水溶液の希釈

\*適に用いられる。安定化剤、酵素賦活剤としては効果を示すものであれば特に限定されず、例えばアルブミン、マグネシウムイオン等が挙げられる。

【0014】本発明の組成物を用いてカリウムを測定する条件としては、特に厳密に規制するものではないが、反応温度は20~40℃の間で、好ましくは25℃あるいは30℃である。反応時間は1~10分の間が好適である。測定波長としては、340nm付近、または色素を用いた場合は発色した色素のλ<sub>max</sub>付近で測定されることが望ましい。

## 【0015】

【実施例】以下、本発明を実施例により詳細に説明する。

## 実施例1

試料中のカリウムイオン濃度は下記試薬を用いて下記測定法により測定した。

※試料のタイムコースを示す。図2に血清試料の希釈直線性を示す。図3に10mM塩化カリウム水溶液の希釈直線性を示す。図1~3より明らかのように、塩化カリウム水溶液、あるいは血清を試料として用いても、本発明ではナトリウムイオン結合剤を使用せずに、短時間に正確かつ簡単にカリウムイオンを測定することができる。

## 【0018】比較例1

試料中のカリウムイオン濃度を下記試薬を用いて下記測定法により測定した。

★直線性を示す。図5に塩化ナトリウム水溶液を試料とした場合の吸光度変化を示す。また図6に実施例1に示した測定による塩化ナトリウムを試料とした場合の吸光度変化を示す。図4~6より明らかのように、従来のビルビン酸キナーゼを用いた方法ではナトリウム塩により吸光度が変化するが、本発明ではナトリウム塩の影響を受けて試料中のカリウムイオンを測定することができ

る。

【0020】

【発明の効果】本発明のカリウムイオン測定用組成物を用いることにより、試料中のカリウムイオンを、ナトリウムイオン結合剤を使用せずに、短時間に正確かつ簡単に定量することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】10 mM 塩化カリウム水溶液と血清試料のタイムコースを示す。

【図2】血清試料の希釈直線性を示す。

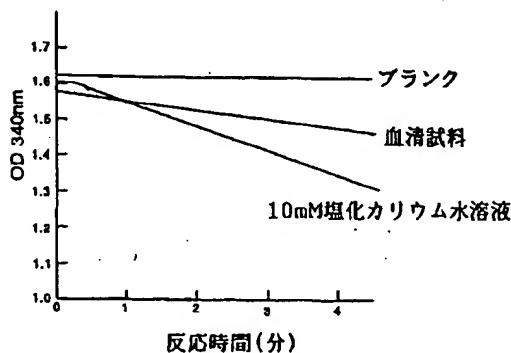
【図3】10 mM 塩化カリウム水溶液の希釈直線性を示す。

【図4】10 mM 塩化カリウム水溶液の希釈直線性を示す。

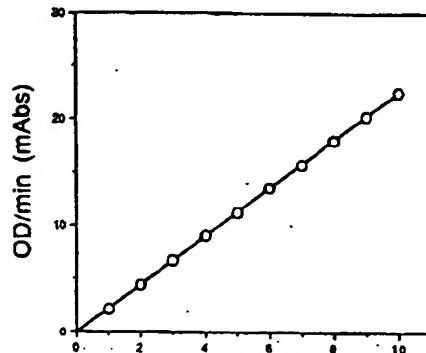
【図5】塩化ナトリウム水溶液による吸光度変化を示す。

【図6】塩化ナトリウム水溶液による吸光度変化を示す。

【図1】

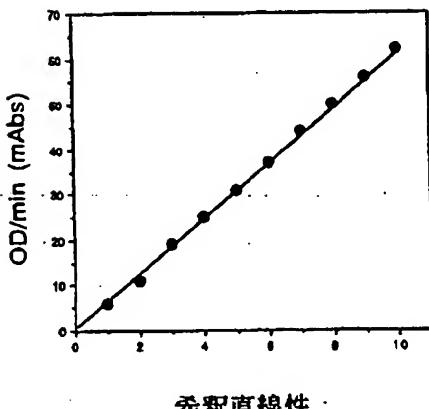


【図2】



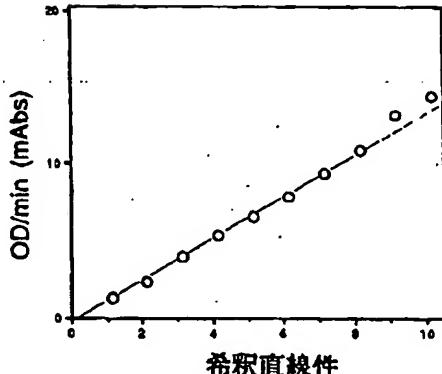
希釈直線性

【図3】



希釈直線性

【図4】

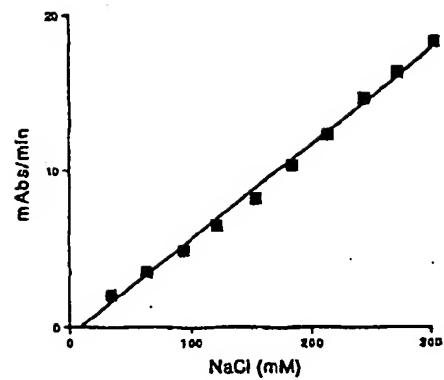


希釈直線性

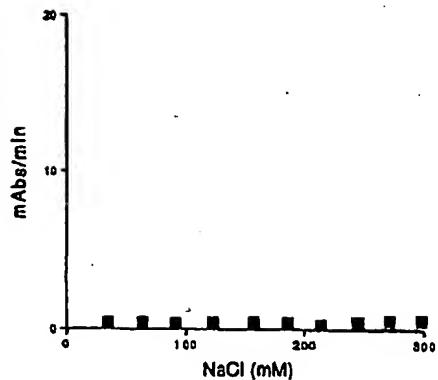
(5)

特開平6-311897

【図5】



【図6】



10/665, 888

PTO 05-2090 HAMT

Japanese Patent  
Document No. 06-311897

**POTASSIUM ION MEASUREMENT COMPOSITION**

[□□□□□□□□□□□□]

Yoshiaki Nishiya; Shinichi Tejima; Shigenori Ukemizu

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE  
Washington, D.C. February 2005

Translated by: Schreiber Translations, Inc.

(19) [Publication Office]

Japan Patent Office (JP)

(12) [Kind of Document]

Unexamined Patent Publication (A)

(11) [Publication Number of Unexamined Application]

Japan Unexamined Patent Publication Hei 6- 311897

(43) [Publication Date of Unexamined Application]

1994 (1994) November 8\*

(43) [Publication Date of Unexamined Application]

1994 (1994) November 8\*

(54) [Title of Invention]

**POTASSIUM ION MEASUREMENT COMPOSITION**

(51) [International Patent Classification, 5th Edition]

C12Q 1/58 6807-4B

1/527 6807-4B

[Number of Claims]

1

[Form of Application]

OL

[Number of Pages in Document]

5

[Request for Examination]

Unrequested

(21) [Application Number]

Japan Patent Application Hei 5- 103034

(22) [Application Date]

1993 (1993) April 28

(71) [Applicant]

[Identification Number]

3160

[Name]

**TOYOBO CO. LTD. (DB 69-053-8160)**

[Address]

Osaka Prefecture Osaka City Kita-ku Dojimahama 2-2-8

(72) [Inventor]

[Name]

Yoshiaki Nishiya

[Address]

Fukui Prefecture Tsuruga City Toyo-cho 10-24 Toyobo Co.  
Ltd. (DB 69-053-8160) Tsuruga bio research laboratory \*

(72) [Inventor]

[Name]

Shinichi Tejima

[Address]

Fukui Prefecture Tsuruga City Toyo-cho 10-24 Toyobo Co.  
Ltd. (DB 69-053-8160) Tsuruga bio research laboratory \*

(72) [Inventor]

[Name]

Shigenori Ukemizu

[Address]

Fukui Prefecture Tsuruga City Toyo-cho 10-24 Toyobo Co.  
Ltd. (DB 69-053-8160) Tsuruga bio research laboratory \*

(57) [Abstract]

[Objective]

To present a composition component which is used for enzymatic measurement of potassium ion concentration which does not require the sodium ionic bond agent, but is superior in workability, quantitative behavior, and accuracy.

[Constitution]

Potassium ion measurement composition which contains urea amide lyase , urea , adenosine triphosphoric acid or its salt , bicarbonate ion and magnesium ion.

[Effect(s)]

Because urea amide lyase does not operate on the sodium ion, and is not effected by the sodium ion, the potassium ion in the specimen can be measured accurately.

[Claim(s)]

[Claim 1]

A composition for potassium ion measurement composition wherein there are (a ) urea amide lyase , (b ) urea , (c ) adenosine triphosphoric acid or its salt , (d ) bicarbonate ion, and (e ) magnesium ion.

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Field of Industrial Application]

This invention is related compositions that are used to measure potassium.

The measurement for potassium ion in the body's fluid, gives significant clinical meaning, namely, information about acute renal failure and chronic renal failure or other kidney diseases, idiopathic [arudesuteron] symptoms and other useful information pertaining to secondary [arudesuteron] symptoms or other endocrine disorder symptoms.

[0002]

[Prior Art]

Until recently, the flame brightness meter method and the chemical measurement method, and the ion selection electrode method etc have been used as measurement methods of metal ion, including potassium ion in body fluid.

But, because the flame brightness meter method operation was problematic, treatment capacity of the specimen became an issue.

There is a problem for the chemical measurement method that in addition to the procedure being complicated, the accompanying experimental drugs are expensive and in clinical investigations, have hardly been used.

The comparative operation is simple for the ion selection electrode method, but because of electrode degradation when measuring, problems occur because of deviation generation.

In addition, recently, the measurement method of potassium ion with the enzymatic method is reported. (Clin. Chem. 1989;35:817-820, Japan Unexamined Patent Publication Hei 1- 503596 Disclosure ).

Pyruvic acid kinase uses activation by potassium ion for this method

But, pyruvic acid kinase is activated in same way as potassium ion even with the sodium ion.

Therefore, in body fluid, in order to reduce the influence of sodium ion which exists in large amounts in comparison

with the potassium ion, there was a problem that necessitated the addition of expensive sodium binder .

[0003]

[Problems to be Solved by the Invention]

The goal of this invention, in keeping with the above-mentioned conditions, is to provide a composition which is used for enzymatic measurement which does not require a sodium ionic bond agent, but is superior in operability, quantitative behavior, and accuracy.

[0004]

[Means to Solve the Problems]

These inventors' diligent investigation was conducted using a method which measures potassium ion concentration in a test agent with, the urea amide lyase activated by the potassium ion , but by the sodium ion, a finding illustrating a superior characteristic.

Therefore, by utilizing urea amide lyase , without using a sodium ionic bond agent , potassium ion concentration in body fluid can be measured simply and accurately with high sensitivity, thus producing the invention.

[0005]

Namely, this invention is a composition for the measurement of potassium ion wherein there is included (a ) urea amide lyase , (b ) urea , (c ) adenosine triphosphoric acid or its salt , (d ) bicarbonate ion and that (e ) magnesium ion.

[0006]

Urea amide lyase (URL) acts as a catalyst in this invention for the following reaction.

[Chemical Formula 1]

URL

URL

尿素+重炭酸イオン+ATP → アロファン酸+ADP → アンモニア

K<sup>+</sup>, Mg<sup>++</sup>

[0007]

In measuring the potassium ion within the experimental materials by using the composition for measuring this invention's potassium ion with the existence of potassium and magnesium ion within the experimental materials, use is made of urea amide lyase in urea, the substrate, bicarbonate ion and ATP.

[0008]

The origin of the urea amide lyase, used for this invention, is not especially limited.

The urea amide lyase found in single cell green algae, yeast, other microbial, can be used, but that originating in the Genus *Saccharomyces*, or Genus *Candida* are ideal.

[0009]

Sodium bicarbonate, lithium bicarbonate or other bicarbonate ion is used as the bicarbonate ion.

You cannot use potassium salt as the bicarbonate ion.

Magnesium sulfate, magnesium chloride or other magnesium salts is used as the magnesium ion,.

[0010]

The means for measuring the generated ammonia consists of the following methods: with the existence of  $\alpha$ -keto glutaric acid and NADH or NADPH, a method which uses glutamic acid dehydrogenase and measures the ammonia by the reduction in absorption of the ultraviolet portion, and a method, with the existence of glutamine and ATP, using glutamine synthetase and the glutamine oxidase in glutamine and measuring the hydrogen peroxide which generates the ammonia, and the method using salicylic acid, sodium hypochlorite, and sodium nitroprusside measuring

indophenol which creates the ammonia, using the light absorption at 560nm, and a method which directly measures ammonia from an ammonia electrode.

[0011]

The enzyme concentration which is used for the measurement of urea amide lyase used in this invention is not especially controlled by a concentration appropriate for measurement, but normally its appropriate use is in the range 0.01 - 10 U/ml .

The concentration which is used for urea, adenosine triphosphoric acid or its salt , bicarbonate ion or magnesium ion is not especially controlled for a concentration appropriate for measurement, but the urea that is usually used is in the range of 1 - 500 mM , and the adenosine triphosphoric acid or its salt is ideally in a range of 0.1 - 10 mM .

Bicarbonate ion is usually 5 - 500 mM, and the ideal range for magnesium ion is 1 - 100 mM .

[0012]

The pH of this invention's composition for potassium ion measurement is ideally maintained at pH 6~8 by a buffer or more preferably by a substance that does not contain any potassium.

A list might comprise for example, triethanolamine buffer , GOOD buffer , and tris buffer.

[0013]

Reagents of this invention , according to demand, might include a boundary surfactant , antiseptic , stabilizer , enzyme activator.

A nonionic surfactant is appropriate for a boundary surfactant.

$\text{NaN}_3$  or antibiotic is appropriate as an antiseptic.

Without being especially limited, if it shows effectiveness as a stabilizer or enzyme activator, albumin and magnesium ion can be cited.

[0014]

The conditions under which measurement of the potassium are taken using the composition of this invention, is not especially controlled, but the reaction temperature should be between 20 - 40 deg C, preferably 25 deg C or is 30 deg C.

An appropriate reaction time is between 1 - 10 minutes.

For the measurement wavelength, when using in the vicinity of 340nm or a dye, it is desirable that the measurement be taken in the  $\lambda_{max}$  vicinity of the dye that is colored.

[0015]

[Working Example(s)]

Below, this invention is explained in detail with Working Examples .

Working Example 1

It measured potassium ion concentration in a specimen by the below-mentioned measurement method making use of the below-mentioned reagent .

reagent						
[torisu ] Buffer solution (pH 8. 0)					0.05 M	
Ureaamidoriaaze (sakkaromaisesu origin)					0.2 U/m	
Urine urea					200 mM	

[adenosin ] Three triphosphoric acid sodium salt					1 mm	
* magnesium sulfate					10 mm	
Heavy sodium bicarbonate					4 mm	
Gurutamin acid dehydrogenase [puroteusu origin]					100 U/m	
$\alpha$ -keto glutaric acid					1 mm	
NADPH					0.5 mM	

[0016]

#### Measurement method

Assume 10 steps diluent and blood serum 10 steps diluent of potassium chloride aqueous solution 10mM as specimens respectively, extract each 100 $\mu$ l react for 5 minutes at 30 deg C by adding the above-mentioned reagent 3ml , and

require a time course at 340 nm (behavior where enzymatic reaction advances by measured wavelength ) with an absorbance change of 1 minute .

Furthermore, blank used distilled water in place of the potassium ionic test solution .

[0017]

Figure 1 shows 10 mM potassium chloride aqueous solution and time course of the blood serum specimen .

Dilution linearity of the blood serum specimen is shown in Figure 2 .

Dilution linearity of 10 mM potassium chloride aqueous solution is shown in Figure 3.

As is clear from Figures 1 ~3, even using the potassium chloride aqueous solution, or the blood serum , as a specimen, without using sodium ionic bond agent , potassium ion can be measured accurately and simply in a short time .

[0018]

#### Comparative Example 1

The potassium ion concentration in the specimen was measured by the following measurement method making use of the following reagent .

reagent							
[torisu] Lis buffer							
pyruvate kinase ( rabbit muscle origin)							

phosphoenolpyruvic acid						1 mM	
[adenosin ] syn disodium phosphate						6 mM	
Hydrochloric magnate						5 mM	
Lactic acid dehydrogenase (microbe origin)					10 U/m		
NADH					0	5 mM	

#### Measurement method

With a 10 step diluent pf potassium chloride aqueous solution as the specimen, , each 40  $\mu$ l and adding 3.2ml of the reagent, react for 5 min at 30 degrees, seeking an absorbance change in 1 minutes for 340nm.

Furthermore, blank required distilled water in place of the inspection solution containing potassium.

[0019]

Figure 4 shows the dilution linearity of 10 mM potassium chloride aqueous solution.

Figure 5 shows the absorbance change when the sodium chloride aqueous solution is designated as the specimen.

In addition, Figure 6 shows the absorbance change when sodium chloride is designated as the specimen for measurement in Working Example 1.

As is clear from Figure 4 ~6, with the method which uses conventional pyruvic acid kinase, the absorbance changes with sodium salt , but in this invention without any effect from sodium salt , the potassium ion in specimen can be measured.

[0020]

[Effects of the Invention]

By using this invention's composition for measuring potassium ion in a specimen , without using a sodium ionic bond agent , it is possible to quantify in a short time accurately and simply.

[Brief Explanation of the Drawing(s)]

[Figure 1]

10 mM potassium chloride aqueous solution and time course of the blood serum specimen are shown.

[Figure 2]

Dilution linearity of the blood serum specimen is shown.

[Figure 3]

Dilution linearity of the 10 mM potassium chloride aqueous solution is shown.

[Figure 4]

Dilution linearity of the 10 mM potassium chloride aqueous solution is shown.

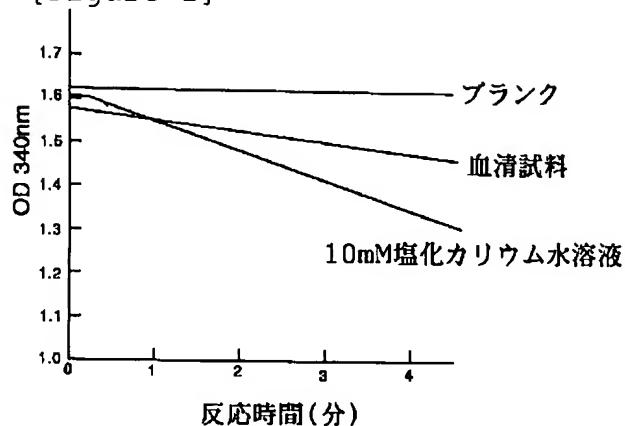
[Figure 5]

Absorbance change is shown with the sodium chloride aqueous solution .

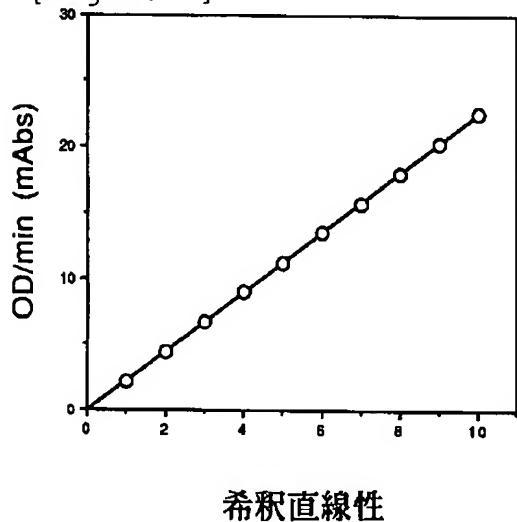
[Figure 6]

Absorbance change is shown with the sodium chloride aqueous solution .

[Figure 1]

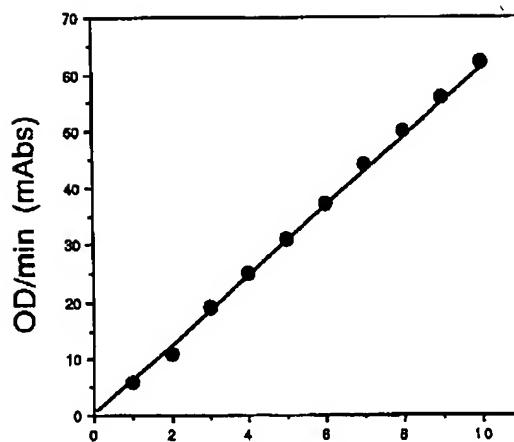


[Figure 2]



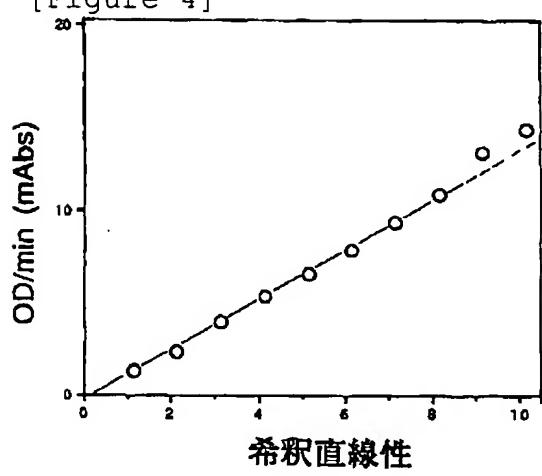
希釈直線性

[Figure 3]



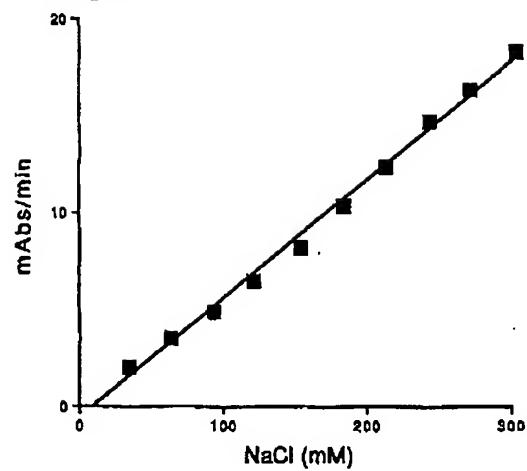
希釈直線性

[Figure 4]



希釈直線性

[Figure 5]



[Figure 6]

